

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/54, 15/82, 9/10, A01H 5/00		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04103 (43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01125		(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 18 juillet 1996 (18.07.96)		Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 95/08979 19 juillet 1995 (19.07.95) FR			
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR] ; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): LEBRUN, Michel [FR/FR] ; 224, rue de Saint-Cyr, F-69009 Lyon (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR] ; 38, rue Ernest-Fabregue, F-69009 Lyon (FR). FREYSSINET, Georges [FR/FR] ; 21, rue de Nervieux, F-69450 Saint-Cyr-au-Mont-D'Or (FR).			
(74) Mandataire: CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie, Boite postale 9163, F-69263 Lyon Cédex 09 (FR).			
(54) Title: MUTATED 5-ENOL PYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE, GENE CODING FOR SAID PROTEIN AND TRANSFORMED PLANTS CONTAINING SAID GENE			
(54) Titre: 5-ENOL PYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE MUTEE, GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE ET PLANTES TRANSFORMEES CONTENANT CE GENE			
(57) Abstract			
A mutated glyphosate resistance gene of 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) including at least one substitution of threonine 102 by isoleucine, and useful for producing glyphosate-resistant transformed plants, is disclosed.			
(57) Abrégé			
Gène de résistance au glyphosate. 1) Gène muté de résistance au glyphosate. 2) Gène EPSPS comprenant au moins une substitution de la Thréonine 102 par l'isoleucine. 3) Il est utilisable pour l'obtention de plantes transformées résistantes au glyphosate.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Liberia	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

5-énol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutée, gène codant pour cette protéine et plantes transformées contenant ce gène.

La présente invention concerne une nouvelle 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (ou EPSPS), qui présente une tolérance accrue vis à vis des herbicides inhibiteurs compétitifs vis à vis du phosphoenolpyruvate (PEP) de l'activité EPSPS. Cette EPSP synthase plus tolérante présente au moins une substitution "Thréonine par Isoleucine". Elle concerne également un gène codant pour une telle protéine, des cellules végétales transformées par des constructions gènes chimères contenant ce gène, les plantes régénérées à partir de ces cellules ainsi que les plantes issues de croisement utilisant ces plantes transformées.

Le glyphosate, le sulfosate ou la fosamétine sont des herbicides systémiques à large spectre de la famille des phosphonométhylglycines. Ils agissent essentiellement comme inhibiteurs compétitifs de la 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EC 2.5.1.19) ou EPSPS vis à vis du PEP(phosphoenolpyruvate). Après leur application sur la plante, ils sont véhiculés dans la plante où ils s'accumulent dans les parties à croissance rapide, notamment les apex caulinaires et racinaires, provoquant l'altération jusqu'à la destruction des plantes sensibles.

L'EPSPS plastidiale, cible principale de ces produits est une enzyme de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, qui est codée par un ou des gènes nucléaires et synthétisée sous forme d'un précurseur cytoplasmique puis importée dans les plastes où elle s'accumule sous sa forme mature.

La tolérance des plantes au glyphosate et aux produits de la famille est obtenue par introduction stable dans leur génome d'un gène d'EPSPS d'origine végétale ou bactérienne mutée ou non quant aux caractéristiques d'inhibition par le glyphosate du produit de ce gène. Etant donné le mode d'action du glyphosate et le degré de tolérance au glyphosate du produit des gènes utilisés, il est intéressant de pouvoir exprimer le produit de la traduction de ce gène de façon à permettre son accumulation importante dans les plastes.

Il est connu, par exemple d'après le brevet américain 4 535 060, de conférer à une plante une tolérance à un herbicide du type ci-dessus, en particulier la N-phosphonométhylglycine ou glyphosate, par introduction dans le génome des plantes d'un gène codant pour une EPSPS portant au moins une mutation rendant cette enzyme plus résistante à son inhibiteur compétitif (le glyphosate) après localisation de l'enzyme dans le compartiment plastidial. Ces techniques demandent cependant à être améliorées pour obtenir une plus grande fiabilité dans l'emploi de ces plantes en conditions agronomiques.

Dans la présente description, on entend par "plante" tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse et par "cellule végétale" toute cellule issue d'une

plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals ou des tissus différenciés tels que des embryons ou des parties de plantes ou des semences.

La présente invention a pour objet la production de plantes transformées ayant une tolérance accrue aux herbicides de la famille des phosphonométhylglycines par 5 régénération de cellules transformées à l'aide de nouveaux gènes chimères comportant un gène de tolérance à ces herbicides.

L'invention a également pour objet un gène chimère pour conférer aux plantes une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide ayant pour cible l'EPSPS, comprenant, dans le sens de la transcription: une zone promotrice, éventuellement une zone peptide de transit, une 10 séquence d'un gène codant pour une enzyme de tolérance au glyphosate et une zone signal de polyadénylation non traduite en 3', caractérisé en ce que le gène de tolérance au glyphosate comporte, par rapport au gène dont il est dérivé, une substitution "Thréonine 102 par Isoleucine" dans la zone "aroA"(EPSPS). De manière préférée, elle comprend en outre, dans la même zone une substitution "Proline 106 par Sérine". Ces substitutions 15 peuvent être introduites, ou être présentes, dans une séquence d'EPSPS d'origine quelconque: notamment végétale, bactérienne, d'algues ou de champignon.

Les peptides de transit utilisables dans la zone de peptide de transit peuvent être en soi connus, d'origine végétale, par exemple issus de maïs, de tournesol, de pois, de tabac ou autres. Le premier et le second peptide de transit peuvent identiques, analogues ou 20 différents. Ils peuvent en outre comprendre chacun une ou plusieurs unités peptide de transit selon la demande de brevet européen EP 0 508 909. Cette zone caractéristique a comme rôle de permettre le relargage d'une protéine mature et native, et en particulier l'EPSPS mutée ci-dessus, avec une efficacité maximale dans le compartiment plasmidique.

La zone promotrice du gène chimère selon l'invention peut être composée 25 avantageusement d'au moins un promoteur ou un fragment d'un promoteur de gène s'exprimant naturellement dans les plantes...(tubuline, introns actine, histone).

La zone signal de terminaison de la transcription non traduite en 3' du gène chimère peut être d'origine quelconque, par exemple bactérienne telle que celle du gène de la 30 nopaline synthase, ou végétale telle que celle du gène histone H4A748 d' *Arabidopsis thaliana* selon la demande de brevet européen (demande européenne 633 317).

Le gène chimère selon l'invention peut comprendre, en plus des parties essentielles ci-dessus, au moins une zone intermédiaire non traduite (linker), qui peut être localisés entre les différentes régions transcrtes décrites ci-dessus. Cette zone intermédiaire peut être 35 d'origine quelconque, par exemple bactérienne, virale ou végétale.

Isolement d'un ADNc codant pour une EPSPS de maïs:

Les différentes étapes, qui ont conduit à l'obtention de l'ADNc d'EPSPS de maïs, qui a servi de substrat à l'introduction des deux mutations, sont décrites ci-dessous. Toutes les opérations décrites ci-dessous sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, 5 effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al , publiés par Greene Publishing 10 Associates et Wiley -Interscience (1989)(Par la suite, les références à des protocoles décrits dans cet ouvrage seront notées "réf. CPMB"). Les opérations concernant l'ADN, qui ont été effectuées selon les protocoles décrits dans cet ouvrage sont, en particulier les suivantes: ligation de fragments d'ADN, traitements par l'ADN polymérase de Klénow et la T4 ADN polymérase, préparation d'ADN de plasmides et de bactériophages λ soit en 15 minipréparation soit en maxi préparation, analyses d'ADN et d'ARN respectivement selon les techniques de Southern et Northern. D'autres méthodes décrites dans cet ouvrage ont été suivies, et seules les modifications ou ajouts significatifs à ces protocoles ont été décrits ci-dessous.

20 Exemple 1:**1. Obtention d'un fragment d'EPSPS d' *Arabidopsis thaliana***

a) deux oligonucléotides 20-mers de séquences respectives:

5'- GCTCTGCTCATGTCTGCTCC -3'

5'- GCCCGCCCTTGACAAAGAAA- 3'

25 ont été synthétisés à partir de la séquence d'un gène d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* (Klee H.J. et al. (1987) Mol. Gen. Genet., 210, 437-442). Ces deux oligonucléotides sont respectivement en position 1523 à 1543 et 1737 à 1717 de la séquence publiée et en orientation convergente.

30 b) L'ADN total d'*Arabidopsis thaliana* (var. *columbia*) a été obtenu chez Clontech (référence catalogue: 6970-1)

c) On mélange 50 nanogrammes(ng) d'ADN avec 300ng de chacun des oligonucléotides et soumis à 35 cycles d'amplification avec un appareil Perkin-Elmer 9600, dans les conditions de milieu standard pour l'amplification préconisées par le fournisseur. Le fragment de 204pb résultant constitue le fragment d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*.

35

2. Construction d'une bibliothèque d'un ADNc à partir d'une ligne cellulaire de maïs BMS .

a) On broye 5 g de cellules filtrées dans l'azote liquide et les acides nucléiques totaux extraits selon la méthode décrite par Shure et al. avec les modifications suivantes:

5 - le pH du tampon de lyse est ajusté à PH = 9,0;
-après la précipitation par l'isopropanol, le culot est repris dans l'eau et après dissolution, ajusté à 2,5 M LiCl. Après incubation pendant 12 h à °C, le culot de la centrifugation d 15 min. à 30000g à 4°C est resolubilisé. L'étape de précipitation par LiCl est alors répétée. Le culot resolubilisé constitue la fraction ARN des acides nucléiques totaux.

10 b) La fraction ARN-polyA+ de la fraction ARN est obtenue par chromatographie sur colonne oligo-dT cellulose telle que décrite dans "Current Protocols in Molecular Biology".

c) Synthèse d'ADNc double brin à extrémité synthétique EcoRI: elle est réalisée en suivant le protocole du fournisseur des différents réactifs nécessaires à cette synthèse sous forme d'un kit: le "copy kit" de la société In Vitrogen.

15 Deux oligonucléotides simples brins et partiellement complémentaires de séquences respectives:

5'- AATTCCCGGG -3'

5'- CCCGGG- 3' (ce dernier étant phosphorylé)

sont liqués avec les ADNc double brin à extrémités franches.

20 Cette ligation des adaptateurs résulte en la création de sites Sma I accolés aux ADNc double brin et EcoRI sous forme cohésive à chaque extrémité des ADNC double brin.

d) Création de la bibliothèque:

Les ADNc présentant à leurs extrémités les sites artificiels cohésifs EcoRI sont liqués avec le ADNc du bactériophage λ gt10 coupé par EcoRI et déphosphorylé selon le protocole du fournisseur New England Biolabs.

25 Une aliquote de la réaction de ligation a été encapsidée *in vitro* avec des extraits d'encapsidation: Gigapack Gold selon les instructions du fournisseur, cette librairie a été titrée en utilisant la bactérie *E. coli* C600 hfl . la librairie ainsi obtenue est amplifiée et stockée selon les instructions du même fournisseur et constitue la librairie de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS.

3. Criblage de la bibliothèque de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS avec la sonde EPSP d'*Arabidopsis thaliana*:

30 Le protocole suivi est celui de "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al , publiés par Greene Publishing Associates et Wiley-Interscience (1989)(CPMB). En bref, environ 10^6 phages recombinants sont étalés sur boîte LB à une densité moyenne de 100 phages /cm². Les plages de lyses sont répliqués en doubles sur membrane Hybond N d'Amersham.

h) L'ADN a été fixé sur les filtres par traitement UV 1600kJ (Stratalinker de Stratagene). Les filtres sont été préhybridés dans: 6xSSC/0,1%SDS/0,25 lait écrémé pendant 2h à 65°C. La sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été marquée au ³²P-dCTP par "random-priming" selon les instructions du fournisseur (Kit Ready to Go de Pharmacia). L'activité spécifique obtenue est de l'ordre de 10⁸ cpm par µg de fragment. Après dénaturation pendant 5 min à 100°C, la sonde est ajoutée dans le milieu de préhybridation et l'hybridation est poursuivie pendant 14 heures à 55°C. Les filtres sont fluorographiés 48h à -80°C avec un film KodakXAR5 et des écrans renforçateurs Hyperscreen RPN d'Amersham. L'alignement des spots positifs sur le filtre avec les boîtes d'où ils sont issus permet de prélever, sur la boîte, des zones correspondant aux phages présentant une réponse d'hybridation positive avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Cette étape d'étalement, transfert, hybridation, récupération est répétée jusqu'à ce que tous les spots de la boîte des phages successivement purifiés se révèlent positifs à 100% en hybridation. Une plage de lyse par phage indépendant est alors prélevée dans du milieu λ diluant (Tris-Cl pH= 7,5; MgSO₄ 10mM; NaCl 0,1M; gélatine 0,1%), ces phages en solution constituant les clones positifs de l'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

4. Préparation et analyse de l'ADN des clones d'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

On ajoute environ 5.10⁸ phages à 20 ml de bactéries C600hfl à 2 OD 600nm/ml et incubés 15 minutes à 37°C. Cette suspension est alors diluée dans 200ml de milieu de croissance des bactéries dans un Erlen de 1L et agitée dans un agitateur rotatif à 250 rpm. La lyse est constatée par clarification du milieu, correspondant à 1 lyse des bactéries turbides et se produit après environ 4 h d'agitation. Ce surnageant est alors traité comme décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN obtenu correspond aux clones d'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

Un à deux µg de cet ADN sont coupés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l'ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone présentant un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* et contenant le plus long fragment EcoRI a une taille estimée sur gel à environ 1,7kpb.

5. Obtention du clone pRPA-ML-711:

Dix μ g de l'ADN du clone phagique contenant l'insert de 1,7kpb sont digérés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert de 1,7kpb est excisé du gel par coloration BET et le fragment est traité à la β -agarse selon le protocole du fournisseur New England Biolabs. L'ADN purifié du fragment de 1,7kpb est ligué à 12°C pendant 14h avec l'ADN du plasmide pUC 19 (New England Biolabs) coupé par EcoRI selon le protocole de ligation décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Deux μ l du mélange de ligation ci-dessus sont utilisés pour la transformation d'une aliquote d'E.coli DH10B électro compétentes ; la transformation se fait par électroporation en utilisant les conditions suivantes: le mélange 5 de bactéries compétentes et de milieu de ligation est introduit dans une cuvette d'électroporation d'épaisseur 0,2cm (Biorad) préablement refroidie à 0°C. Les conditions physiques de l'électroporation utilisant un électroporateur de marque Biorad sont 2500 Volts, 25 μ Farad et 200 Ω . Dans ces conditions, le temps de décharge moyen de condensateur est de l'ordre de 4,2 millisecondes. Les bactéries sont alors reprises dans 1 ml 10 de milieu SOC (réf. CPMB) et agitées pendant 1 heure à 200 rpm sur un agitateur rotatif dans des tubes Corning de 15 ml. Après étalement sur milieu LB/agar supplémenté à 100 μ g/ml de carbénicilin, les mini-préparations des clones bactériens ayant poussé après une nuit à 37 °C est réalisée selon le protocole décrit dans "Current Protocols in Molecular 15 Biology". Après digestion par EcoRI de l'ADN et séparation en électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%, les clones présentant un insert de 1,7kpb sont conservés. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l'ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N 20 d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone plasmidique présentant un insert de 1,7kpb et hybridant avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été préparé à plus grande échelle et l'ADN résultant de la lyse des bactéries purifié sur gradient de CsCl ainsi 25 que décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN purifié a été partiellement séquencé avec un kit Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant comme amorces, les amorces universelles de M13 directes et inverses commandées chez le même fournisseur. La séquence partielle réalisée couvre environ 0,5 kpb. La séquence dérivée en acides aminés dans la région de la protéine mature (environ 50 résidus acides aminés) présente une identité de 100% avec la séquence aminée correspondante de l'EPSPS mature de maïs décrite dans le brevet américain USP 4 971 908). Ce clone correspondant à un fragment EcoRI de 1,7kpb de l'ADN de l'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS a été nommé pRPA-ML-711. La séquence complète de ce clone a été réalisée sur les deux brins en utilisant le protocole du kit Pharmacia et en 30 35

synthétisant des oligonucléotides complémentaires et de direction opposée tous les 250 pb environ. La séquence complète de ce clone de 1713 pb obtenue est présentée par SEQ ID N° 1.

5 **6. Obtention du clone pRPA-ML-715:**

L'analyse de la séquence du clone pRPA-ML-711 et en particulier la comparaison de la séquence d'acides aminés dérivés avec celle de maïs montre une extension de séquence de 92 pb en amont du codon GCG codant pour l'Alanine NH2-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908). De même une extension de 288 pb en 10 aval du codon AAT codant pour l'asparagine COOH-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908) est observée. Ces deux parties pourraient correspondre, pour l'extension NH2-terminale à une portion de la séquence d'un peptide de transit pour la localisation plastidiale et pour l'extension COOH-terminale à la région 3' non traduite de l'ADNc.

15 Afin d'obtenir un ADNc codant pour la partie mature de l'ADNc de l'EPSPS de maïs, telle que décrite dans l' USP 4 971 908, les opérations suivantes ont été réalisées:

20 **a) Elimination de la région 3' non traduite: construction de pRPA-ML-712:**

Le clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction AseI et les extrémités résultant de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I selon le protocole décrit dans CPMB. Une coupure par l'enzyme de restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces opérations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 1%.

25 Le fragment de gel contenant l'insert "AseI-extrémités franches/SacII" de 0,4 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. L'ADN du clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII située dans le polylinker du vecteur de clonage pUC19 et les extrémités résultant de cette coupure ont été rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 30 0,7%.

35 Le fragment de gel contenant l'insert HindIII-extrémités franches/SacII de environ 3,7 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus.

Les deux inserts ont été ligués, et 2 µl du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DHIOB ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5.

40 On analyse le contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite pour pRPA-ML-711. Un des clones plasmidique retenu contient un insert EcoRI-HindIII de 1,45 kpb environ. La séquence des extrémités terminales de ce clone révèle que

l'extrémité 5' de l'insert correspond exactement à l'extrémité correspondante de pRPA-ML-711 et que l'extrémité 3' terminale présente la séquence suivante:

" 5'...AATTAAGCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT-3' ".

La séquence soulignée correspond au codon de l'acide aminé COOH-terminal
5 asparagine, le codon suivant correspondant au codon stop de la traduction. Les nucléotides en aval correspondent à des éléments de séquence du polylinker de pUC19. Ce clone comprenant la séquence de pRPAML-711 jusqu'au site de terminaison de la traduction de l'EPSPS mature de maïs et suivie de séquences du polylinker de pUC 19 jusqu'au site HindIII a été nommé pRPA-ML-712.

10 b) Modification de l'extrémité 5' de pRPA-ML-712: construction de pRPA-ML-715

Le clone pRPA-ML-712 a été coupé par les enzymes de restrictions PstI et HindIII. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert PstI/EcoRI de 1,3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été mis en ligation en présence de quantité équimoléculaire de chacun des deux oligonucléotides partiellement complémentaires, de séquence:

Oligo1: 5'-GAGCCGAGCTCCATGGCCGGCGCCGAGGAGATCGTGCTGCA-3'

Oligo 2: 5'-GCACGATCTCCTCGCGCCGGCCATGGAGCTCGGCTC-3'

20 ainsi qu'en présence d'ADN du plasmide pUC19 digéré par les enzymes de restrictions BamHI et HindIII.

Deux µl du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DH10B ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au paragraphe 5, un des clones 25 présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence de l'extrémité 5' terminale du clone retenu révèle que la séquence ADN dans cette région est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à BamHI, suivi de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage, suivi du reste de la séquence présente dans pRPAML-712. Ce clone a été nommé pRPA-ML-713. Ce clone présente un 30 codon methionine ATG inclu dans un site NcoI en amont du codon Alanine N-terminal de l'EPSPSynthase mature. De plus, les codons alanine et glycine de l'extrémité N-terminale ont été conservées, mais modifiées sur la troisième base variable : GCGGGT initial donne GCGGGC modifié.

Le clone pRPA-ML-713 a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII et les 35 extrémités de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de la ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert "HindIII-extrémités

franches/SacI" de 1,3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été mis en ligation en présence d'ADN du plasmide pUC19 digéré par l'enzyme de restriction XbaI et les extrémités de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. Deux μ l du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DHIOB ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au paragraphe 5, un des clones présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence des extrémités terminales du clone retenu révèle que la séquence ADN est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à SacI, suivie de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage déléteé des 4 pb GATCC de l'oligonucléotide 1 décrit ci-dessus, suivi du reste de la séquence présente dans pRPA-ML-712 jusqu'au site HindIII et séquence du polylinker de pUC19 de XbaI à HindIII. Ce clone a été nommé pRPA-ML-715.

15

7) Obtention d'un ADN codant pour une EPSPS de maïs mutée

Toutes les étapes de mutagénèse ont été réalisées avec le U.S.E. mutagenesis kit de Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur. Le principe de ce système de mutagénèse est le suivant: l'ADN plasmidique est dénaturé par la chaleur et réassocié en présence d'un excès molaire d'une part de l'oligonucléotide de mutagénèse, et d'autre part d'un oligonucléotide permettant d'éliminer un site d'enzyme de restriction unique présent dans le polylinker. Après l'étape de réassociation, la synthèse du brin complémentaire est réalisée par l'action de la T4 ADN polymérase en présence de T4 ADN ligase et de protéine du gène 32 dans un tampon approprié fourni. Le produit de synthèse est incubé en présence de l'enzyme de restriction, dont le site est supposé avoir disparu par mutagénèse. La souche d'*E. coli* présentant, en particulier, la mutation mutS est utilisée comme hôte pour la transformation de cet ADN. Après croissance en milieu liquide, l'ADN plasmidique total est préparé, incubé en présence de l'enzyme de restriction utilisée précédemment. Après ces traitements, la souche d'*E. coli* DHIOB est utilisée comme hôte pour la transformation. L'ADN plasmidique des clones isolés est préparé et la présence de la mutation introduite vérifiée par séquençage.

A)- modifications de sites ou de séquence sans incidence a priori sur le caractère de résistance de l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPSP synthase: élimination d'un site NcoI interne de pRPA-ML-715.

35 La séquence de pRPA-ML-715 est numérotée arbitrairement en plaçant la première base du codon Alanine N-terminal GCC en position 1. Cette séquence présente un site NcoI en position 1217. L'oligonucléotide de modification du site présente la séquence :

5'-CCACAGGATGGCGATGGCCTTCTCC-3'.

Après séquençage selon les références données ci-dessus, la séquence lue après mutagénèse correspond à celle de l'oligonucléotide utilisé. Le site NcoI a bien été éliminé et la traduction en acides aminés dans cette région conserve la séquence initiale présente sur pRPA-ML-715.

5 Ce clone a été nommé pRPA-ML-716..

La séquence de 1340 bp de ce clone est présentée SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 3.

B) modifications de séquence permettant l'augmentation du caractère de résistance de l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPSP synthase.

10 Les oligonucléotides suivants ont été utilisés :

a) mutation Thr 102 → Ile.

5'-GAATGCTGGAATCGCAATGCGGCCATTGACAGC-3'

b) mutation Pro 106 → Ser.

15 5'-GAATGCTGGAACTGCAATGCGGTCTTGACAGC-3'

c) mutations Gly 101 → Ala et Thr 102 → Ile.

5'-CTTGGGAAATGCTGCCATCGCAATGCGGCCATTG-3'

20 d) mutations Thr 102 → Ile et Pro 106 → Ser.

5'-GGGAAATGCTGGAATCGCAATGCGGTCTTGACAGC-3'

Après séquençage, la séquence lue après mutagénèse sur les trois fragments mutés est identique à la séquence de l'ADN parental pRPA-ML-716 à l'exception de la région mutagénésée qui correspond à celle des oligonucléotides de mutagénèse utilisés. Ces clones ont été nommés : pRPA-ML-717 pour la mutation Thr 102 → Ile, pRPA-ML-718 pour la mutation Pro 106 → Ser, pRPA-ML-719 pour les mutations Gly 101 → Ala et Thr 102 → Ile et pRPA-ML-720 pour les mutations Thr 102 → Ile et Pro 106 → Ser.

La séquence de 1340 bp de pRPA-ML-720 est présentée SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 5.

30

L'insert NcoI-HindIII de 1395 pb est à la base de toutes les constructions utilisées pour la transformation des plantes pour l'introduction de la résistance aux herbicides inhibiteurs compétitifs de l'EPSPS et en particulier la résistance au glyphosate. Cet insert sera nommé dans la suite des descriptions "le double mutant de l'EPSPS de maïs".

35

Exemple 2:

Tolérance au glyphosate des différents mutants in vitro.

2.a: Extraction de l'EPSP synthase.

Les différents gènes d'EPSP synthases sont introduits sous forme d'une cassette NcoI-HindIII dans le vecteur plasmidique pTrc99a (Pharmacia, ref : 27-5007-01) coupé par NcoI et HindIII. Les *E. coli* DH10B recombinantes surexprimant les différents EPSP synthases sont soniquées dans 40 ml de tampon par 10 g de cellules culottées et lavées avec ce même

5 tampon (tris HCl 200 mM pH 7,8, mercaptoethanol 50 mM, EDTA 5 mM et PMSF 1 mM), auxquels on ajoute 1 g de polyvinylpirrolidone. La suspension est agitée pendant 15 minutes à 4°C, puis centrifugée 20 minutes à 27000g et 4°C.

Le surnageant est additionné de sulfate d'ammonium pour amener la solution à 40% de la saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé 20 minutes à 27000g et 4°C.

10 Le nouveau surnageant est additionné de sulfate d'ammonium pour amener la solution à 70% de la saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé 30 minutes à 27000g et 4°C. L'EPSP synthase, présente dans ce culot protéique, est reprise dans 1 ml de tampon (tris HCl 20 mM pH 7,8 et mercaptoethanol 50 mM). Cette solution est dialysée une nuit contre deux litres de ce même tampon à 4°C.

15 **2.b: Activité enzymatique.**

L'activité de chaque enzyme ainsi que sa résistance au glyphosate est mesurée in vitro sur 10 minutes à 37°C dans le mélange réactionnel suivant: acide maléique 100 mM pH 5,6, phosphoénol pyruvate 1 mM, shikimate-3-phosphate 3 mM (préparé selon Knowles P.F. et Sprinson D.B. 1970. Methods in Enzymol 17A, 351-352 à partir de *Aerobacter aerogenes* strain ATCC 25597) et fluorure de potassium 10 mM. L'extrait enzymatique est ajouté au dernier moment après l'addition de glyphosate dont la concentration finale varie de 0 à 20 mM.

20 L'activité est mesurée par dosage du phosphate libéré selon la technique de Tausky H.A. et Shorr E. 1953. J. Biol. Chem. 202, 675-685.

25 Dans ces conditions, l'enzyme sauvage (WT) est inhibée à 85% dès la concentration de 0,12 mM de glyphosate. A cette concentration, l'enzyme mutante connue Ser106 n'est inhibée qu'à 50% et les trois autres mutants Ile102, Ile102/Ser106, Ala101/Ile102 ne sont pas ou peu inhibées.

30 Il faut multiplier la concentration de glyphosate par dix, soit 1,2 mM, pour inhiber l'enzyme mutante Ile102 à 50%, les mutants Ile102/Ser106, Ala/Ile et Ala n'étant toujours pas inhibés.

Il faut noter que l'activité des mutants Ala/Ile et Ala n'est pas inhibée jusqu'à des concentrations de 10 mM de glyphosate, et que celle du mutant Ile102/Ser106 n'est pas réduite même si la concentration en glyphosate est multipliée par 2, soit 20 mM.

35 **Exemple 3:**

Résistance des plantes de tabac transformés.

1-1- Transformation.

Le vecteur pRPA-RD-173 est introduit dans la souche *d'Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood et al., 1987) porteuse du cosmide pTVK291 (Komari et al., 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh et al. (1985).

1-2- Régénération.

5 La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/1 de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et transformées selon la technique des disques foliaires (Science, 1985, Vol 227, p.1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend 10 l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30g/1 de saccharose contenant 0,05 mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30g/1 de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu 15 d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

1-3- Résistance au glyphosate.

20 Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour la construction pRPA-RD-173. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension acqueuse de RoundUp correspondant à 0,8kg de matière active glyphosate par hectare.

Les résultats correspondent à l'observation d'indices de phytotoxicité relevés 3 semaine après traitement. Dans ces conditions, on constate que les plantes transformées par la construction pRPA-RD-173 présentent une très bonne tolérance alors que les plantes témoins non transformées sont complètement détruites.

25 Ces résultats montrent clairement l'amélioration apportée par l'utilisation d'un gène chimère selon l'invention pour un même gène codant pour la tolérance au glyphosate.

Exemple 4:

Transformation et sélection de cellules de maïs.

30 Des cellules de maïs BMS (Black Mexican Sweet) en phase exponentielle de croissance sont bombardées avec la construction pRPA-RD-130 selon le principe et le protocole décrit par Klein et al 1987 (Klein TM, Wolf ED, Wu R and Sandford JC (1987): High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells NATURE vol 327 p 70-73)

35 Deux jours après le bombardement, les cellules sont transférées sur le même milieu contenant 2mM de N(phosphométhyl)glycine.

Après 8 semaines de sélection sur ce milieu, des cais se développant sont sélectionnés puis amplifiés et analysés par PCR et révèlent clairement la présence du gène chimère PTO-EPSPS.

Les cellules non bombardées et mises en croissance sur le même milieu contenant 5 2mM de N(phosphométhylglycine) sont bloquées par l'herbicide et ne se développent pas.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent être utilisées comme parents pour l'obtention de lignées et d'hybrides ayant le caractère phénotypique correspondant à l'expression du gène chimère introduit.

Description des constructions des plamides

5 pRPA-RD-124: Addition d'un signal de polyadénylation "nos" à pRPA-ML-720 avec
création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS double mutant de maïs (Thr
102 → Ile et Pro 106 → Ser). pRPA-ML-720 est digérée avec Hind III, traité avec le
fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* pour produire une extrémité franche.
On effectue une seconde digestion avec Nco I et le fragment EPSPS est purifié. Le gène
EPSPS est ensuite ligué avec pRPA-RD-12 purifié (une cassette de clonage contenant le
10 signal de polyadénylation de la nopaline synthase) pour donner pRPA-RD-124. Pour
obtenir le vecteur pRPA-RD-12 purifié utile, il a fallu que celui-ci soit préalablement
digéré par Sall, traité avec l'ADN polymérase de Klenow, puis digéré une seconde fois avec
Ncol.

15 pRPA-RD-125: Addition d'un peptide de transit optimisé (PTO) à pRPA-RD-124 avec
création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS ciblé sur les plasmides.
pRPA-RD-7 (demande de brevet européen EP 652 286) est digérée avec Sph I, traité avec
la T4 ADN polymérase, puis digérée avec Spe I et le fragment PTO est purifié. Ce
fragment PTO est cloné dans pRPA-RD-124 qui a été préalablement digérée par Ncol,
traité avec l'ADN polymérase de Klenow pour enlever la partie protubérante 3', puis
20 digérée par Spe I. Ce clone est alors séquencé pour assurer la fusion traductionnelle
correcte entre le PTO et le gène d'EPSPS. On obtient alors pRPA-RD-125.

25 pRPA-RD-130: Addition du promoteur d'histone de maïs H3C4 et de séquences
d'intron 1 adhl de pRPA-RD-123 (demande de brevet EP 507 698) à pRPA-RD-125 avec
création d'une cassette pour expression dans les plantes pour l'expression du gène d'EPSPS
double mutant dans les tissus de monocotylédones. pRPA-RD-123 (une cassette contenant
le promoteur d'histone de maïs H3C4 fusionné avec l'intron 1 adhl) est digérée avec Nco I
et Sac I. Le fragment d'ADN contenant le promoteur dérivé de pRPA-RD-123 est ensuite
purifié et ligué avec pRPA-RD-125, qui a été préalablement digéré avec Nco I et Sac I.

30 pRPA-RD-159: Addition du promoteur double d'histone de *d'arabidopsis* H4A748
(demande de brevet EP 507 698) à pRPA-RD-125 avec création d'une cassette pour
expression dans les plantes pour l'expression du gène "PTO- gène d'EPSPS double mutant"
dans les tissus de dicotylédones. pRPA-RD-132 (une cassette contenant le promoteur
double H4A748 (demande de brevet EP 507 698)) est digérée avec Nco I et Sac I. Le
fragment purifié du promoteur est ensuite cloné dans qui a été digéré avec Eco I et Sac I.

35 pRPA-RD-173: Addition du gène "promoteur H4A748-PTO-gène d'EPSPS double
mutant" de pRPA-RD-159 dans plasmide pRPA-BL-150A (demande de brevet européen
508 909) avec création d'un vecteur de transformation *Agrobacterium tumefaciens*. pRPA-

RD-159 est digéré avec Not I et traité avec la polymérase de Klenow. Ce fragment est ensuite cloné dans pRPA-BL-150A avec Sma I.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Lebrun, Michel
De Rose, Richard T
Salland, Alain

(ii) TITLE OF INVENTION: 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutée, gène codant pour cette protéine et plantes transformées contenant ce gène

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 5

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: Francois Chretien
(B) STREET: 1420 rue Pierre Baizet
(C) CITY: Lyon Cedex 09
(E) COUNTRY: France
(F) ZIP: 69263

(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: Chretien, Francois

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: (33)72-29-26-46
(B) TELEFAX: (33)72-29-28-43

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1713 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Zea mays
(B) STRAIN: Black Mexican Sweet
(F) TISSUE TYPE: Callus

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
(A) LIBRARY: lambda gt10
(B) CLONE: pRPA-ML-711

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

AATCAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTAGC AATTCGGGCC CGGGCGCGTG	60
ATCCGGGGGC GGCAGCGGCG GGGCGGGTGC AGGCGGGTGC CGAGGAGATC GTGCTGCAGC	120
CCATCAAGGA GATCTCCGGC ACCGTCAAGC TGCCGGGGTC CAAGTCGCTT TCCAAACCGGA	180
TCTCTCTACT CGCCGGCGTG TCCGAGGGGA CAACAGTGGT TGATAACCTG CTGAAACAGTG	240
AGGATGTCCA CTACATGCTC GGGGCTTGA GGACTCTTGG TCTCTCTGTC GAAGCGGACA	300
AAGCTGCCAA AAGAGCTGTA GTTGTGGCT GTGGTGGAAA GTTCCAGTTT GAGGATGCTA	360
AAGAGGAAGT GCAGCTCTTC TTGGGGAATG CTGGAACCTGC AATGGGGCCA TTGACAGCAG	420
CTGTTACTGC TGCTGGTGGA AATGCAACTT ACGTGCTTGA TGGAGTACCA AGAATGAGGG	480

AGAGACCCAT TGGAGACTTC GTTGTCGGAT TGAACGACT TGGTGAGAT GTTGATGTT 540
 TCTTGGCAC TGAATGCCA CCTGTTCTG TCAATGGAAT CGGAGGGCTA CCTGGTGGCA 600
 AGTTCAGCT GTCTGGCTCC ATCAGCACTC AGTACTTCAG TCCCTGGCTG ATGGCTGCTC 660
 CTTGGCTCT TGGGGATG GAGATGAAA TCATTGATAA ATTAACTCC ATTCCGTACG 720
 TCGAAATGAC ATTGAGATG ATGGAGCGTT TTGGTGTGAA AGCAGAGCA TCTGATAGCT 780
 GGGACAGATT CTACATTAAG GGAGGTCAAA AATAAAGTC CCTTAAAAAT GCCTATGTTG 840
 AAGGTGATGC CTCAAGCGCA AGCTATTTCT TGGCTGGTGC TGCAATTACT GGAGGGACTG 900
 TGACTGTGGA AGGTTGTGGC ACCACCACTT TGCAGGGTGA TGTGAAGTTT GCTGAGGTAC 960
 TGGAGATGAT GGGAGCGAAG GTTACATGGA CGAGACTAG CGTAACATGTT ACTGGCCAC 1020
 CGGGGGAGCC ATTGGGAGG AAACACCTCA AGGCGATTGA TGTCAACATG AACAAAGATGC 1080
 CTGATGTCG CAGTACTCTT GCTGTGGTTG CCTCTTTGC CGATGGCCCG ACAGCCATCA 1140
 GAGAOGTGGC TTCTGGAGA GTAAAGGAGA CGGAGAGGAT GGTTGGGATC CGGACGGAGC 1200
 TAACCAAGCT GGGAGCATCT GTTGAGGAAG GGCAGGACTA CTGCATCATC ACGCCGCG 1260
 AGAAGCTGAA CGTGACGGG ATCGACACGT ACGACGACCA CAGGATGGCC ATGGCCTTCT 1320
 CCTTGGCGC CTGTGGCGAG GTCCCGGTCA CCATCGGGGA CCTGGGTGC ACCCGGAAGA 1380
 CCTTCCCCGA CTACTTCGAT GTGCTGAGCA CTTTGTGAA GAATTAAATAA AGCGTGCGAT 1440
 ACTAACACGC AGCTTGATTG AAGTGTAGG CTGCTGCTGA GGAAATACAT TTCTTTGTT 1500
 CTGTTTTCTT CTTCACGGG ATTAAAGTTT GAGTCTGAA CGTTAGTTGT TTGTAGCAAG 1560
 TTTCATTTTC GGATCTTAAG TTGCTGACT GTAAAGCAGA TTTCATTTCA AGAGTGGTC 1620
 GTTGGAAATAA TAAGAATAAT AAATTACGTT TCAGTAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA 1680
 AAAAAAAA AAAAAAAA AACCGGGAA TTC 1713

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1340 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Zea mays
- (B) STRAIN: Black Mexican Sweet

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (B) CLONE: pRPA-ML-716

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 6..1337

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

CCATG	GCC	GCC	GCC	GAG	GAG	ATC	GTG	CTG	CAG	CCC	ATC	AAG	GAG	ATC	47	
Ala	Gly	Ala	Glu	Glu	Ile	Val	Leu	Gln	Pro	Ile	Lys	Glu	Ile			
1					5					10						
TOC	GGC	ACC	GTC	AAG	CTG	CCG	GGG	TCC	AAG	TCG	CTT	TCC	AAC	CGG	ATC	95
Ser	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Leu	Ser	Asn	Arg	Ile	
15					20					25					30	
CTC	CTA	CTC	GCC	CTG	TCC	GAG	GGG	ACA	ACA	GTG	GTT	GAT	AAC	CTG	143	
Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Val	Asp	Asn	Leu		
35					40					45						
CTG	AAC	AGT	GAG	GAT	GTC	CAC	TAC	ATG	CTC	GGG	GCC	TTG	AGG	ACT	CTT	191
Leu	Asn	Ser	Glu	Asp	Val	His	Tyr	Met	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Thr	Leu	

40	55	60	
GGT CTC TCT CTC GAA GCG GAC AAA CCT GCC AAA AGA GCT GTC GTC GTT Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val	65 70	75	239
GGC TGT GGT GGA AAG TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln	80 85	90	287
CTC TTC TTG GGG AAT GCT GGA ACT GCA ATG CCG CCA TTG ACA GCA GCT Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala	95 100	105	335
GTT ACT GCT GCT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTA CCA Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro	115 120	125	383
AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln	130 135	140	431
CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val	145 150	155	479
CGT GTC AAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT Arg Val Asn Gly Ile Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser	160 165	170	527
GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro	175 180	185	575
TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Asp Lys Leu Ile Ser	195 200	205	623
ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val	210 215	220	671
AAA GCA GAG CAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly	225 230	235	719
CAA AAA TAC AAG TCC CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser	240 245	250	767
AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val	255 260	265	815
ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe	275 280	285	863
GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr	290 295	300	911
AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CGG CGG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His	305 310	315	959
CTC AAG GCG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met	320 325	330	1007
ACT CTT GCT GTG GTT GGC CTC TTT GGC GAT GGC CCG ACA GCC ATC AGA Thr Leu Ala Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg	335 340	345	1055
GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile	355 360	365	1103
CGG ACG GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CGG GAC Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp			1151

370	375	380	
TAC TGC ATC ATC ACG CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395			1199
ACG TAC GAC GAC CAC AGG ATG GCC ATG GCC TCC TCC CTT GCC GCC TGT Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys 400 405 410			1247
GCC GAG GTC CCC GTC ACC ATC CGG GAC CCT GGG TGC ACC CGG AAG ACC Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr 415 420 425 430			1295
TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440			1337
TAA			1340

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 444 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30

Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45

Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60

Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80

Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95

Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110

Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125

Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140

Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160

Asn Gly Ile Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175

Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190

Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205

Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220

Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240

Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255

Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285
 Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300
 Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335
 Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350
 Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
 370 375 380
 Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
 385 390 395 400
 Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
 405 410 415
 Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
 420 425 430
 Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 435 440

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 1340 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: Zea mays
 (B) STRAIN: Black Mexican Sweet

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: pRPA-ML-720

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 6..1337

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

CCATG GCC GGC GCC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC	47
Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile	
1 5 10	
TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CGG ATC	95
Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile	
15 20 25 30	
CTC CTA CTC GCC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG	143
Leu Leu Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu	
35 40 45	
CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT	191
Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu	
50 55 60	
GGT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT GCC AAA AGA GCT GTA GTT GTT	239
Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val	
65 70 75	

GGC TGT GGT GGA AAT TAC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln 80 85 90	287
CTC TTC TTC (X) AAT GCT GGA ATC GCA ATG CGG TCC TTT ACA GCA GCT Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala 95 100 105 110	335
GTT ACT GCT GCT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTC CCA Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro 115 120 125	383
AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GCC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln 130 135 140	431
CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val 145 150 155	479
CGT GTC AAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT Arg Val Asn Gly Ile Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser 160 165 170	527
GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro 175 180 185 190	575
TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser 195 200 205	623
ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val 210 215 220	671
AAA GCA GAG CAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly 225 230 235	719
CAA AAA TAC AAG TCC CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser 240 245 250	767
AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 255 260 265 270	815
ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Thr Val Glu Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 275 280 285	863
GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300	911
AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CGG CCG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 305 310 315	959
CTC AAG GCG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 320 325 330	1007
ACT CTT GCT GTG GTT GGC CTC TTT GGC GAT GGC CCG ACA GCA GCC ATC AGA Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 335 340 345 350	1055
GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile 355 360 365	1103
CGG ACG GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380	1151
TAC TGC ATC ATC ACG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395	1199

ACG TAC GAC GAC CAC ARG ATG GCG ATG GCC TTC TCC CTT GCC CCC TGT	1247
Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys	
400 405 410	
GCG GAG GTC CCC GTC ACC ATC CGG GAC CCT GGG TGC ACC CGG AAG ACC	1295
Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr	
415 420 425 430	
TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT	1337
Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn	
435 440	
TAA	1340

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 444 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly	
1 5 10 15	
Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu	
20 25 30	
Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn	
35 40 45	
Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu	
50 55 60	
Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys	
65 70 75 80	
Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe	
85 90 95	
Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val Thr	
100 105 110	
Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met	
115 120 125	
Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly	
130 135 140	
Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val	
145 150 155 160	
Asn Gly Ile Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser	
165 170 175	
Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala	
180 185 190	
Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro	
195 200 205	
Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala	
210 215 220	
Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys	
225 230 235 240	
Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala	
245 250 255	
Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val	
260 265 270	
Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu	
275 280 285	

Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
290 295 300

Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
304 310 315 320

Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
325 330 335

Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
340 345 350

Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
370 375 380

Ile Ile Thr Pro Pro Glu Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
385 390 395 400

Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
405 410 415

Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
420 425 430

Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
435 440

REVENDICATIONS

1. Gène ADN codant pour une 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) mutée, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une substitution Thréonine 102 → Isoleucine.
5
2. Gène ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en plus au moins une seconde mutation dans l'EPSPS, distincte de la première.
10
3. Gène ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend en plus une mutation constituée par une substitution Proline 106 par la Sérine.
15
4. Gène ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend en plus une mutation constitué par une substitution de la Glycine 101 par l'Alanine.
15
5. Gène ADN selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est d'origine bactérienne.
20
6. Gène ADN selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est issu d'une bactérie du genre *Salmonella typhimurium*.
25
7. Gène ADN selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est d'origine végétale.
25
8. Gène ADN selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est d'origine de maïs.
30
9. Protéine EPSPS mutée caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une substitution de la Thréonine 102 par l'isoleucine.
30
10. Gène chimérique comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend, comme séquence codante, au moins une séquence selon l'une des revendications 1 à 8.
35
11. Gène chimérique selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur de virus de plante.
35

12. Gène chimérique selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur de plante (ex: α tubuline, histone, introns, actine...).

5 13. Vecteur pour la transformation des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend, au moins un gène selon l'une des revendications 10 à 12.

14. Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un gène selon l'une des revendications 10 à 12.

10 15. Plante, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par régénération à partir d'une cellule selon la revendication 14.

15 16. Procédé pour la production de plantes de tolérance améliorée à un herbicide ayant pour cible l'EPSP synthase, caractérisé en ce qu'on transforme des cellules végétales ou protoplastes avec un gène selon l'une des revendications 1 à 8 et qu'on soumet les cellules transformées à une régénération.

20 17. Procédé de traitement des plantes avec un herbicide ayant l'EPSPS pour cible, caractérisé en ce qu'on applique l'herbicide à des plantes selon la revendication 15.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on applique du glyphosate ou un précurseur du glyphosate.

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶: C12N 15/54, 15/82, A01H 5/00</p>		A3	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04103 (43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01125 (22) Date de dépôt international: 18 juillet 1996 (18.07.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/08979 19 juillet 1995 (19.07.95) FR</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p>	
<p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): LEBRUN, Michel [FR/FR]; 224, rue de Saint-Cyr, F-69009 Lyon (FR). AILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Ernest-Fabrègue, F-69009 Lyon (FR). FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nerville, F-69450 Saint-Cyr-au-Mont-D'Or (FR).</p> <p>(74) Mandataire: CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cédex 09 (FR).</p>		<p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i></p> <p>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 20 mars 1997 (20.03.97)</p>	
<p>(54) Title: MUTATED 5-ENOL PYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE, GENE CODING FOR SAID PROTEIN AND TRANSFORMED PLANTS CONTAINING SAID GENE</p> <p>(54) Titre: 5-ENOL PYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE MUTEE, GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE ET PLANTES TRANSFORMEES CONTENANT CE GENE</p> <p>(57) Abstract A mutated glyphosate resistance gene of 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) including at least one substitution of threonine 102 by isoleucine, and useful for producing glyphosate-resistant transformed plants, is disclosed.</p> <p>(57) Abrégé Gène de résistance au glyphosate. 1) Gène muté de résistance au glyphosate. 2) Gène EPSPS comprenant au moins une substitution de la Thréonine 102 par l'isoleucine. 3) Il est utilisable pour l'obtention de plantes transformées résistantes au glyphosate.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Liberia	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettone	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No
PCT/FR 96/01125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/54 C12N15/82 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, XP002023052 RUFF T., ET AL.: "EFFECTS OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS ON GLYPHOSATE TOLERANCE AND ACTIVITY OF EPSPS. ALBUQUERQUE, NEW MEXICO, USA, JULY 28-AUGUST 1, 1991. PLANT PHYSIOL(BETHESDA) 96 (1 SUPPL.). 1991. 94."	1,7,9
Y	abstract 592	2-6,8, 10-18
Y	--- WO 92 06201 A (MONSANTO CO) 16 April 1992 see the whole document	2-6,8, 10-18
Y	--- WO 91 04323 A (MONSANTO CO) 4 April 1991 see the whole document	2-6,8, 10-18
	---	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *'&' document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

30 January 1997

Date of mailing of the international search report

31.01.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentstaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/01125

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 293 358 A (MONSANTO CO) 30 November 1988 see the whole document ---	4
Y	EP 0 507 698 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 7 October 1992 see the whole document ---	3,5,6,12
X	WO 95 06128 A (DEKALB GENETICS CORP) 2 March 1995 see page 119, line 16 - page 120, line 20 see page 150, line 14 - line 23 see page 166, line 4 - page 167, line 19 ---	1-3,7-18
A	J BIOL CHEM 266 (33). 1991. 22364-22369., XP002023053 PADGETTE S R, ET AL.: "SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF A CONSERVED REGION OF THE 5 ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE ACTIVE SITE." see the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 96/01125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9206201	16-04-92	AT-T- 118820 AU-A- 8719291 CA-A- 2090617 DE-D- 69107621 EP-A- 0550633 JP-T- 6501615	15-03-95 28-04-92 29-03-92 30-03-95 14-07-93 24-02-94
WO-A-9104323	04-04-91	US-A- 5310667 AU-B- 640179 AU-A- 6638190 CA-A- 2059266 EP-A- 0409815 EP-A- 0483287	10-05-94 19-08-93 18-04-91 18-01-91 23-01-91 06-05-92
EP-A-0293358	30-11-88	US-A- 4971908 AT-T- 108203 AU-A- 1660188 CN-A- 1032030 DE-D- 3850527 DE-T- 3850527 ES-T- 2058338 JP-A- 1039984 US-A- 5145783 US-A- 5312910	20-11-90 15-07-94 01-12-88 29-03-89 11-08-94 22-12-94 01-11-94 10-02-89 08-09-92 17-05-94
EP-A-0507698	07-10-92	FR-A- 2673642 AU-B- 652417 AU-A- 1144392 CA-A- 2061835 JP-A- 5076369 US-A- 5491288	11-09-92 25-08-94 10-09-92 06-09-92 30-03-93 13-02-96
WO-A-9506128	02-03-95	AU-A- 7716994 CA-A- 2170260 EP-A- 0721509 ZA-A- 9406488	21-03-95 02-03-95 17-07-96 30-11-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 96/01125

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/54 C12N15/82 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation munimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation munimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche utilisée

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS.,, XP002023052 RUFF T., ET AL.: "EFFECTS OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS ON GLYPHOSATE TOLERANCE AND ACTIVITY OF EPSPS. ALBUQUERQUE, NEW MEXICO, USA, JULY 28-AUGUST 1, 1991. PLANT PHYSIOL(BETHESDA) 96 (1 SUPPL.). 1991. 94." * abrégé 592 *	1,7,9
Y	---	2-6,8, 10-18
Y	WO,A,92 06201 (MONSANTO CO) 16 Avril 1992 voir le document en entier ---	2-6,8, 10-18
Y	WO,A,91 04323 (MONSANTO CO) 4 Avril 1991 voir le document en entier ---	2-6,8, 10-18
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *'&' document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 Janvier 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31.01.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 96/01125

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 293 358 (MONSANTO CO) 30 Novembre 1988 voir le document en entier ---	4
Y	EP,A,0 507 698 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 7 Octobre 1992 voir le document en entier ---	3,5,6,12
X	WO,A,95 06128 (DEKALB GENETICS CORP) 2 Mars 1995 voir page 119, ligne 16 - page 120, ligne 20 voir page 150, ligne 14 - ligne 23 voir page 166, ligne 4 - page 167, ligne 19 ---	1-3,7-18
A	J BIOL CHEM 266 (33). 1991. 22364-22369., XP002023053 PADGETTE S R, ET AL.: "SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF A CONSERVED REGION OF THE 5 ENOLPYRUVYL SHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE ACTIVE SITE." voir le document en entier -----	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 96/01125

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9206201	16-04-92	AT-T- 118820 AU-A- 8719291 CA-A- 2090617 DE-D- 69107621 EP-A- 0550633 JP-T- 6501615	15-03-95 28-04-92 29-03-92 30-03-95 14-07-93 24-02-94
WO-A-9104323	04-04-91	US-A- 5310667 AU-B- 640179 AU-A- 6638190 CA-A- 2059266 EP-A- 0409815 EP-A- 0483287	10-05-94 19-08-93 18-04-91 18-01-91 23-01-91 06-05-92
EP-A-0293358	30-11-88	US-A- 4971908 AT-T- 108203 AU-A- 1660188 CN-A- 1032030 DE-D- 3850527 DE-T- 3850527 ES-T- 2058338 JP-A- 1039984 US-A- 5145783 US-A- 5312910	20-11-90 15-07-94 01-12-88 29-03-89 11-08-94 22-12-94 01-11-94 10-02-89 08-09-92 17-05-94
EP-A-0507698	07-10-92	FR-A- 2673642 AU-B- 652417 AU-A- 1144392 CA-A- 2061835 JP-A- 5076369 US-A- 5491288	11-09-92 25-08-94 10-09-92 06-09-92 30-03-93 13-02-96
WO-A-9506128	02-03-95	AU-A- 7716994 CA-A- 2170260 EP-A- 0721509 ZA-A- 9406488	21-03-95 02-03-95 17-07-96 30-11-95